



Lipoprotein(a) Ölçümlerinin Standardizasyonu

Standardization of Lipoprotein(a) Determinations

Önder ŞIRIKÇI*

ÖZET

Lp(a), ateroskleroz ve kalp damar hastalıkları ile ilişkisi nedeni ile araştırılan ve ölçülmesi gündemde olan bir lipoproteindir. Diğer lipoproteinlerden farklı olarak yapısındaki apo B'ye bağlı bir apo(a) içerir. Plazminojene ileri derecede homoloji gösteren apo(a)'nın üzerinde bulunan kringle 4 tekrarları nedeni ile Lp(a)'nın ağırlıkları 280-830 kDa arasında değişen 35 izoformu bulunur. Geçtiğimiz yıllarda RID, RIA, ELISA, turbidimetrik ve nefelometrik pek çok yöntem Lp(a) ölçümünde kullanılmıştır. Lp(a) ölçümlerinin doğruluğu ve farklı yöntemlerle elde edilen sonuçların karşılaştırılabilir olabilmesi için söz konusu yöntemin duyarlılığı, doğruluğu ve kesinliği yanısıra, kullanılan antikorun özgüllüğü ve immünokimyasal özellikleri, yöntemin kalibrasyonu ve sonuçların hangi birimle ifade edileceği de standardize edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Lipoprotein(a), apo(a)

ABSTRACT

Lp(a) is a lipoprotein which is subject to an increasing amount of research and determination of blood levels because of its relation with atherosclerosis and cardiovascular disease. Unlike other lipoproteins, it contains an apo(a) bound to apo B, which shows a high degree of homology to plasminogen. The varying number of kringle 4 repeats on

apo(a) result in 35 different Lp(a) isoforms ranging between 280-830 kDa. In the recent years, assays based on RID, RIA, ELISA, turbidimetry, and nephelometry have been utilized in Lp(a) determination. In order to obtain accurate data, and to be able to compare different results obtained with different assays, -in addition to the sensitivity, accuracy and precision of the assay- the specificity and the immunochemical properties of the antibodies used, the calibration of the assay and the unit with which the results will be expressed should also be standardized.

Keywords: Lipoprotein(a), apo(a).

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

GİRİŞ

YAPISAL ÖZELLİKLER

Lp(a) ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN ANTIKORLARIN ÖZGÜLLÜĞÜ

İMMUNOASSAYLERİN KALİBRASYONU VE KULLANILACAK BİRİM

KAYNAKLAR

* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Haydarpaşa 81326, İstanbul.

GİRİŞ

Lipoprotein(a), Lp(a) yapıcı ve lipid içeriği olarak düşük dansiteli lipoprotein'e (LDL) çok benzeyen aterojenik bir lipoproteindir. Yapılan klinik çalışmalarda yüksek Lp(a) düzeylerinin miyokard infarktüsü ve koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür. Lp(a) düzeyleri, total kolesterol, trigliseridler, HDL-kolesterol gibi diğer risk faktörleri ile korelasyon göstermemektedir. Serum Lp(a) düzeyleri genetik olarak belirlenir; diyet, yaşam tarzı değişiklikleri ve standart lipid düşürücü tedavilerden etkilenmez. Bireyler arasında 100 kattan fazla fark olan geniş bir dağılım gösteren Lp(a) düzeyleri değişik toplumlarda büyük farklılıklar gösterir(1,2). Bu özellikleri nedeni ile keşfedildiği 1963 yılından beri Lp(a)'nın yapısı ve metabolizması ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve kişilerin kalp ve damar hastalığı riskinin bir göstergesi olarak klinik laboratuvarlarda ölçülmesi gündeme gelmiştir. Ancak bir başka molekülde daha rastlamadığımız kendine özgü özellikleri olan bu lipoprotein'in ölçülmesinde, yöntemlerin kuvvetli ve zayıf yönlerinden başka, molekülün yapısal özelliklerinden kaynaklanan zorluklar bulunduğu anlaşılmıştır. Lp(a) ölçümünde kullanılacak yöntemlerin apo(a)'da görülen ileri derecedeki boyut heterojenitesi, plazminojene olan yapısal homoloji ve apo B-100 ile kompleks yapıyor olması gibi sorunları aşması gerekir.

YAPISAL ÖZELLİKLER

Lp(a), LDL gibi lipidden zengin bir merkez, bir apolipoprotein B-100 ve apo B'ye disülfid bağları ile kovalan olarak bağlı bir apolipoprotein(a) (apo(a)) içerir. Bu apo(a) proteini Lp(a)'yı diğer tüm lipoproteinlerden farklı kılar. Protein kütesinin (%30'unu oluşturan karbohidrat içeriğinin yanısıra, apo(a) proteini oldukça fazla yapı ve boyut polimorfizmi de gösterir. Apo(a), plazminojene yüksek oranda yapısal homoloji gösterir(3). Plazminojen bir aktif serin proteaz bölgesi ve birden beşe kadar numaralandırılan beş adet 'Kringel' yapısından birer kopya içerir. Kringel, polipeptid zincirinde üç disülfid

bağı ile stabilize edilmiş katlanmalar gösteren yapılara verilen isimdir. Apo(a) üzerinde ise bir inaktif serin proteaz bölgesi ve 11 değişik tip kringel bulunur. Bunlardan sonuncusu, plazminojendeki kringel 5 ile %85 homoloji gösterir, diğer 10 tanesi ise plazminojendeki kringel 4 ile % 78-88 homoloji gösterir. Apo(a) üzerindeki bu kringel 4 benzeri yapılar ise kringel 4 tip 1-10 olarak isimlendirilir(3). Bunlardan kringel 4 tip 1 ve tip 3-10'dan birer kopya bulunurken tip 2 değişik kişilerde 3 ile 40 arasında değişen sayıda bulunur. Bu kringel 4 tip 2'lerin 3-40 kez tekrarlamasından dolayı, molekül ağırlıkları 280-830 kDa arasında değişen Lp(a) izoformları oluşmaktadır. Bugüne dek yapılan tarama çalışmalarında 35 ayrı apo(a) izoformu bulunduğu gen düzeyinde(4) ve insan plazmasında gösterilmiştir(5). Lp(a) üzerinde bir molekül apo(a) bulunmasına rağmen, apo(a) için heterozigot olan kişilerde, iki ayrı apo(a) izoformu bulunduran Lp(a) molekülleri dolayında bulunabilmektedir.

Bir kişide eksprese edilen apo(a) izoformu ile dolaşımdaki Lp(a) düzeyi arasında ters orantılı bir ilişki vardır(6). Az sayıda kringel 4 içeren küçük molekül ağırlıklı apo(a) eksprese eden kişilerde dolaşımdaki Lp(a) düzeyi yüksek, daha fazla sayıda kringel 4 tekrarı içeren yüksek molekül ağırlıklı apo(a) eksprese eden kişilerde dolaşımdaki Lp(a) düzeyi düşük olmaktadır.

Lp(a) ÖLÇÜMÜNDE KULLANILMIŞ OLAN YÖNTEMLER

Lp(a)'nın ilk tanımlanması agaroz jelde jel difüzyonu ile yapılmıştır(7). Lp(a)'nın insan plazmasında ölçülmesi için ise sırası ile radyal immünodifüzyon (RID), elektroimmünoassay ve radyoimmünoassay (RIA) yöntemler geliştirilmiştir(8-11). Daha sonra ise ELISA, immünonefelometrik ve immünoturbidimetrik yöntemler tanımlanmıştır(12-14). Diğer apolipoproteinlerde olduğu gibi her yöntemin kendi avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır ve hiçbir yöntem tek başına ideal değildir. Dolayısı ile en uygun yöntemin seçimi, söz konusu yöntemin duyarlılığı, doğruluğu ve ke-



sinliğine, o laboratuvarın günlük iş yükü, mevcut cihazları, o test için gereken geri dönüşüm süresi ve maliyet analizi gibi kriterlere göre değerlendirilmekte.

RID, Lp(a) ölçümü için ilk geliştirilen yöntemlerin birisidir. Bu yöntem, örneklerin sulandırma gerektirmemesi, hem poliklonal hem de monoklonal antikorlar kullanılabilmesi nedeni ile uygulaması nispeten kolay bir yöntemdir. Ancak, büyük sayıdaki toplum taramaları için elverişli olmaması, duyarlılığının düşük olması, sonuç alma süresinin uzunluğu, otomatize edilememesi ve Lp(a)'daki boyut değişikliklerinden etkilenmesi yöntemin dezavantajları arasındadır.

RIA, duyarlılığı yüksek olan, otomatize edilebilen ve hem monoklonal hem de poliklonal antikorlarla kullanılabilen bir yöntemdir. Dezavantajları ise, özel cihazlar ve deneyimli personel gerektirmesi, yeterli kesinliğe ulaşmak için ikili üçlü çalışılma gerekliliği, raf ömrü kısa olan ve insan sağlığı ve çevre için tehlikeli olan radyoizotop kullanımınıdır.

İmmünoimetrik ve immünoturbidimetrik yöntemler klinik laboratuvar için genelde en uygun olanıdır; tamamen otomatize edilebilirler, yüksek verimliliğe, yüksek kesinliğe sahiptirler, radyoizotop kullanımı gerekmez ve uygulama kolaylığına sahiptirler. Lp(a) boyut değişikliklerinin (küçük ve büyük boyutlu Lp(a) moleküllerinin) farklı ışık saçılımına (nefelometride) ve absorbanansa (turbidimetride) yol açabileceği gibi potansiyel bir risk varsa da, turbidimetrik yöntem ile ELISA arasında yüksek oranda korrelasyon bulunmuş ve "particle-enhanced technology"nin geliştirilmesi ile apo(a) boyut değişikliklerinin Lp(a) ölçümlerine etki etmesi en aza indirilmiştir(15,16). Kullanılan kalibratörde bütün majör apo(a) izoformlarının bulunması da problemin boyutunu küçültebilir.

ELISA yöntemleri radyoizotop kullanımı hariç RIA ile aynı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Lp(a) ölçümünde en yaygın kullanılan yöntem ELISA'dır.

Kullanılan ELISA yöntemlerinin çoğu yarışmalı bağlanma yöntemleri yerine yarışmasız iki basamaklı 'sandwich' formatını kullanmaktadır. Bu yaklaşım ile saflaştırılmış Lp(a)'nın mikrotitre plaklara bağlanma aşaması ortadan kaldırılarak azalmış epitop tanınmasından ortaya çıkabilecek artefaktlar önlenmektedir(15).

Bütün bu faktörler göz önüne alınarak seçilecek yöntemlerin dizaynı optimize edilse ve o laboratuvarın çalışma koşulları için en uygun yöntem seçilse bile, seçilen yöntemin apo(a)'da görülen ileri derecedeki boyut heterojenitesi, apo(a)'nın plazminojene olan yapısal homolojisi ve apo B-100 ile kompleks yapıyor olması gibi sorunları aşması gerekir. Bu sorunları aşılabilmesi için kullanılan antikorun özgüllüğü, yöntemin nasıl kalibre edildiği ve sonuçların hangi birimle ifade edileceği de standartize edilerek elde edilen Lp(a) değerlerinin doğruluğu ve karşılaştırılabilirliği sağlanmalıdır.

KULLANILAN ANTİKORLARIN ÖZGÜLLÜĞÜ

Lp(a)'nın yapısında apo B de bulunduğundan, dolaşımdaki LDL'nin ölçüm sırasında etkileşime neden olmaması için kullanılan antikorların apoB'ye bağlanmaması ve apo(a)'yı tanıyan antikorların ise plazminojen ile çapraz reaksiyon vermemesi gerekir. Lp(a) ölçümünde ilk kullanılan antikorlar poliklonal antikorlardı. Ancak bunlar yeteri kadar karakterize edilmemişti. Özgüllük sorunu, plazminojen ile çapraz reaksiyon vermeyen, apo(a)'ya özgü monoklonal antikorların seçilip üretilebilmesi ile çözülebildi. İmmünoassayler geliştirilirken monoklonal antikorların kullanılması cazip bir çözüm ise de, bu antikorların yeteri kadar iyi seçilip karakterize edilememesi oluşturulan assaylerde teknik artefaktlara yol açabilir. Apo(a) üzerindeki tekrarlayan bölgelerdeki antijenik yapılara yönelik antikorların immünoaktivitesi apo(a) boyutunun bir fonksiyonu olarak değişebilir. Kringle 4 tip 2 üzerinde eksprese edilen bir epitopun sayısı kringle 4 tekrarı sayısı ile değişebileceğinden, immünoaktivitede bir değişikliğin olmaması için tek kopya olarak bulunan

kringle 5 veya proteaz bölgesindeki epitoplardan birisine yönelik veya kringler 4 tip 1 veya tip 3-10'dan birisinde bulunan epitoplara yönelik antikolar seçilmelidir. Albers ve ark., kringler 4 tip 2 üzerindeki epitoplara yönelik bir monoklonal veya poliklonal antikor kullanırsa, kalibratördeki apo(a)'dan daha küçük boyutlu apo(a) izoformlarını içeren örneklerin olduğundan düşük, daha büyük izoformlar içeren örneklerin olduğundan yüksek çıktığını göstermiştir (17).

Apo A-I ve apoB ölçümünde kullanılacak olan antikoların seçimi ve karakterize edilmesi için belirlenen IFCC önerileri apo(a) antikoları için de geçerlidir(18). Antikolar epitop özgüllüğü, Lp(a)'ya olan affinitesi, lipoproteinlerdeki modifikasyonlara (karbohidrat miktarındaki değişiklikler, oksidasyon) duyarlılığı açısından iyi karakterize edilmeli, seçilen antikorun Lp(a)'nın bütün izoformlarına bağlanabildiği gösterilmelidir. Poliklonal antikoların daha fazla kullanıldığı turbidimetrik ve nefelometrik yöntemlerde de, immünoaktivitenin apo(a)'nın boyutuna bağlı olarak değişmediği gösterilmeli ve üretim partileri arasında özgüllük ve reaktivite farkı en aza indirilmelidir.

Lp(a)'nın ELISA ile ölçülmesinde genellikle Lp(a) veya apo(a)'ya yönelik antikolar bağlamak için, apoB, Lp(a) veya apo(a)'ya yönelik antikolar ise ölçüm için kullanılırlar. Albers ve ark.'nın değişik formatlarda düzenlenmiş ELISA assaylerini karşılaştırdıkları çalışmada ölçüm için apoB'yi kullanan yöntemlerin kalibratördeki izoformların molekül ağırlığına duyarlı olduğu, ölçüm için apo(a)'yı kullananların kalibratörden bağımsız olarak benzer sonuçlar verdiği ve farklı kökene sahip antikolar kullanan yöntemlerin ortak kalibratör kullanılarak standardize edilebildiği gösterilmiştir(19).

İMMÜNOASSAYLERİN KALİBRASYONU VE KULLANILACAK BİRİM

Apo(a)'daki tekrarlamayan bölgelerden birisine yönelik antikolar seçildiği zaman bile, geniş bir boyut ve kütle yelpazesi içindeki 35 farklı izoformu

ölçmek için kullanılacak yöntemin nasıl kalibre edileceği sorunu vardır. Örneklerdeki Lp(a) için elde edilebilecek değerlerin farklılığına etki edebilen önemli faktörlerden birisi de kalibratörlerde kullanılmak üzere seçilen apo(a)'nın boyutudur. Aynı deney formatının, değişik boyutta apo(a) içeren kalibratörler ile kalibre edildiği zaman bile örneklerde farklı Lp(a) değerleri elde edilmesine neden olduğu, ve konsantrasyonu molar olarak belirtilen kalibratörlerin kullanılması ile bu sorunun aşılabildiği Marcovina ve ark. tarafından bildirilmiştir(17). Lp(a) ölçümlerinde yaygın kullanılan yöntemlerden birisi sonuçların total kütle olarak verilmesidir. Lipid ve karbohidrat içeriğinde sıklıkla olabilecek değişiklikler göz önüne alındığında total kütle hesabının etkilenmemesi için Lp(a) proteini olarak birimlendirilmesi de önerilmiştir. Protein, lipid veya total kütle olarak birimlendirmenin dezavantajı, kütlelerin izoformlar arası heterojeniteden etkilenmesidir. Lp(a) molekülleri arasındaki bu geniş boyut ve kütle farklılığı göz önüne alındığında en az hataya neden olacak birimlendirme ise kandaki Lp(a) partikülü sayısını (nmol/L) bildirmektir.

Doğruluğun sağlanabilmesi için anahtar aşamalardan birisi referans materyallerinin oluşturulması ve değişik immünoassaylerde kullanılacak kalibratörlerin değerlerinin belirlenmesinde kullanılacak bir primer standart oluşturulmasıdır. Primer standartın mutlak kütlesi bağımsız kimyasal yöntemler ile belirlenerek kalibrasyon sisteminin temeli oluşturulmalıdır. Ancak, Lp(a)'nın yapısındaki apo(a) polimorfizminden ve glikozilasyon derecesinden kaynaklanan boyut heterojenitesi, primer standarttaki Lp(a)'nın kütlelerinin doğru saptanmasını zorlaştırır. Ayrıca, bunun yapılması Lp(a)'nın bireyler arasındaki boyut ve içerik farklılığı sorununu ortadan kaldırmaz. Lp(a) ölçümünde kullanılan immünokimyasal metodlar, apo(a)'ya karşı monoklonal antikolar kullansa da, ve sonuçlarını total protein kütlesi veya total protein olarak belirtse de, değişik apo(a) izoformları arasındaki kütle farkını veya apo(a)/apoB kütle oranını göz önüne almalıdır.



Bunun için, referans materyali ve deney kalibratörlü içerik olarak örneklerle aynı bileşimde olmalıdır. Yapılan çalışmalar, prensipleri ve kullandıkları antikorları farklı olan yöntemlerle elde edilen Lp(a) sonuçları arasındaki farklılıkların ortak bir kalibratör kullanımı ile ortadan kaldırılabileceği veya azaltılabileceğini göstermiştir(17). Bu prensiplerin belirlenmesinden sonra klinik laboratuvarlarda Lp(a) ölçümlerinin standardizasyonu için diyagnostik assay üreticilerinin kullanabileceği Lp(a) referans materyallerinin oluşturulması için de çalışma başlatılmıştır(20).

Sonuç olarak, gerek klinik laboratuvarlarda gerekse bilimsel araştırmalarda üretilen Lp(a) sonuçlarının doğru olması ve farklı laboratuvarlarda elde edilen hasta ve araştırma sonuçlarının karşılaştırılabilir olması için yöntemler kullandıkları antikorların özgüllükleri ve immünokimyasal özellikleri, yöntemin Lp(a) boyut heterojenitesinden etkilenmeyecek şekilde kalibrasyonu ve birimlendirilmesi açısından optimize edilmelidir. Lp(a)'nın bu özelliklerinden dolayı, üreticiler de geliştirdikleri immünoassaylerde kullanılan monoklonal antikorların immünokimyasal özelliklerini açıkça belirtmelidirler.

KAYNAKLAR

- Helmhold, M., Bigge, J., Muche, R., Mainoo, J., Thiery, J., Seidel, D., Armstrong, W.D. (1991) Contribution of the apo(a) phenotype to plasma Lp(a) concentration shows considerable ethnic variation. *J. Lipid Res.* 32, 1919-1928.
- Sandholzer, C., Saha, N., Kark, J.D., Rees, A., Jaross, W., Dieplinger, H., Hopplicher, F., Boerwinkle, E., Utermann, G. (1992) Apo(a) isoforms predict risk for coronary heart disease. A study in six populations. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 12, 1214-1226.
- McClellan, J., Tomlinson, J., Kuang, W.J., Eaton, D., Chen, E., Fless, G., Scanu, A., Lawn, R. (1987) cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330, 132-137.
- Lackner, C., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. (1993) Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a) *Hum. Mol. Genet.* 2, 933-938.
- Marcovina, S.M., Zhang, Z.H., Gaur, V.P., Albers, J.J. (1993) Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American blacks and whites. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191, 1192-1196.
- Gaubatz, J.W., Ghanem, K.I., Guevara, J., Nava, L., Patsch, W., Morrisett, J.D. (1990) Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J. Lipid Res.* 31, 603-613.
- Berg K. (1963) A new serum type system in man- the Lp system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 59, 369-382.
- Albers, J.J., Hazzard, W.R. (1974) Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Lipids* 9, 15-26.
- Molinari, E., Pichler, P., Krempler, F., Kostner, G. (1983) A rapid screening method for pathological lipoprotein Lp(a) concentrations by counterimmunoelectrophoresis. *Clin. Chim. Acta.* 128, 373-378.
- Gaubatz, J.W., Cushing, G.L., Morrisett, J.D. (1986) Quantitation, isolation, and characterization of human lipoprotein(a). *Methods Enzymol.* 129, 167-186.
- Albers, J.J., Adolphson, J.L., Hazzard, W.R. (1977) Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) protein. *J. Lipid Res.* 18, 331-338.
- Labeur, C., Michiels, G., Bury, J., Usher, D.C., Rosencu, M. (1989) Lipoprotein (a) quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *Clin. Chem.* 35, 1380-1384.
- Cazzolato, G., Prakash, G., Green, S., Kostner, G.M. (1983) The determination of lipoprotein Lp(a) by rate and end point nephelometry. *Clin. Chim. Acta.* 135, 203-208.
- Levine, D.M., Sloan, B.J., Donner, J.E., Lorenz, J.D., Henzerling, R. (1992) Automated measurement of Lp(a) by immunoturbidimetric analysis. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 22, 173-178.
- Albers, J.J., Marcovina, S.M., Lodge, M.S. (1990) The unique lipoprotein(a): Properties and immunochemical measurement. *Clin. Chem.* 36, 2019-2026.
- Borque, L., Maside, C., Iglesias, A. (1993) Automated turbidimetry of serum lipoprotein(a). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 31, 869-874.



17. Marcovina, S.M., Albers, J.J., Gabel, B., Koschinsky, M.L., Gaur, V.P. (1995) Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). *Clin. Chem.* 41, 246-255.
18. Marcovina, S., Curtiss, L., Milne, R., Albers J. (1990) Selection and characterization of monoclonal antibodies for measuring plasma levels of apolipoproteins A-I and B. Scientific Division, Committee on Apolipoproteins, Working Group on Antibody Reagents, IFCC Document. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 2, 138-144.
19. Albers, J.J., Marcovina, S.M. (1994) Standardization of Lp(a) measurements. *Chem. Phys. Lipids* 67/68, 257-263.
20. Tate, J., Berg, K., Couderc, R., Dati, F., Kostner, G.M., Marcovina, S.M., Rifai, N., Sakurabayashi, I., Steinmetz, A., (1999) The IFCC standardization project for Lipoprotein(a) measurement- Phase2. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, S114.